

## EP 54675 English Abstract

2/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

003507203

WPI Acc No: 1982-55183E/198227

**Enzyme immunoassay in centrifugal rotor - measuring enzyme activity without phase sepn.**

Patent Assignee: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (BOEF )

Inventor: ALBERT W; EVANEGA G R

Number of Countries: 015 Number of Patents: 009

### Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 54675	A	19820630	EP 81108754	A	19811022	198227 B
DE 3048884	A	19820715				198229
JP 57132060	A	19820816	JP 81206303	A	19811222	198238
DD 201943	A	19830817				198350
CA 1170180	A	19840703				198431
EP 54675	B	19850515				198520
DE 3170532	G	19850620				198526
JP 87032422	B	19870714				198731
US 4743536	A	19880510	US 81331339	A	19811216	198821

Priority Applications (No Type Date): DE 3048884 A 19801223

Cited Patents: DE 2164768; DE 2736527; DE 2907198; DE 2938646; FR 2365124;

FR 2418463; US 3839153; 1.Jnl.Ref

### Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 54675	A	G	15		
----------	---	---	----	--	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

EP 54675	B	G			
----------	---	---	--	--	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

### Abstract (Basic): EP 54675 A

Method for determining one component of a specific binding-protein-binding substance pair comprises incubating a test sample with (1) a predetermined amt. of insolubilised binding component (A) and (2) a reagent contg. a known amt. of one component in enzyme-labelled form. The enzyme content of the liq. phase is then measured in a centrifugal rotor during or after application of a high gravitational force, for as long as the liq. and solid phases are in contact.

(A) are pref. insolubilised by immobilisation on a carrier and/or by crosslinking, esp. they are bonded to latex particles. (A) is esp. an antibody or anti-antibody and the enzyme-labelled component (B) an antigen, hapten, antibody or anti-antibody. Alternatively, (A) is the antigen or hapten and (B) the antibody.

The method is more suited to automation than known ELISA procedures since sepn. of solid and liq. phases and washing are unnecessary and commercial centrifugal analysers can be used. In the presence of a strong gravitational force, bound enzyme takes no part in the enzymatic reaction.

Title Terms: ENZYME; IMMUNOASSAY; CENTRIFUGE; ROTOR; MEASURE; ENZYME;

ACTIVE; PHASE; SEPARATE

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Additional): C12Q-001/00; G01N-033/54

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C; B04-B04C; B04-C03; B11-C07A; B12-K04; D05-A01

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H9

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 81108754.3

51 Int. Cl.<sup>3</sup>: **G 01 N 33/54**

22 Anmeldetag: 22.10.81

30 Priorität: 23.12.80 DE 3048884

71 Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**,  
 Sandhofer Strasse 112-132 Postfach 31 01 20,  
 D-6800 Mannheim 31-Waldhof (DE)

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: 30.06.82  
 Patentblatt 82/26

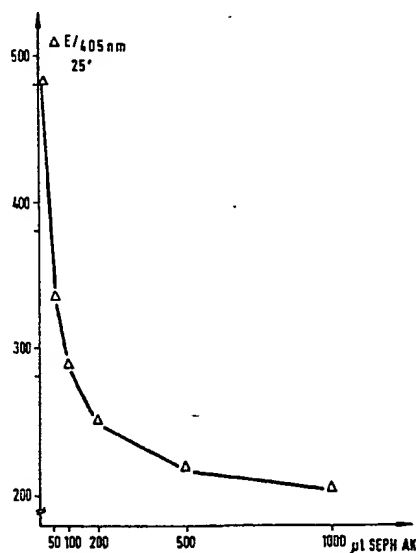
72 Erfinder: **Evanega, George R., Dr.**, 3705 Carmel Drive,  
 Carmel, IN 46032 (US)  
 Erfinder: **Albert, Winfried, Dr.**, Moosstrasse 10,  
 D-8121 Pahl (DE)

84 Benannte Vertragsstaaten: **AT BE CH DE FR GB IT LI LU  
 NL SE**

74 Vertreter: **Weickmann, Heinrich, Dipl.-Ing Patentanwälte**  
 Dipl.Ing.H.Weickmann et al, Dipl.Phys.Dr.K.Fincke  
 Dipl.Ing.F.A.Weickmann Dipl.Chem.B.Huber,  
 Dr.-Ing.H.Liska Möhlstrasse 22, D-8000 München 86 (DE)

### 54 Verfahren zur Enzymimmunbestimmung in heterogener Phase.

57 Zur Bestimmung einer Komponente der Reaktion zwischen einem spezifisch bildenden Protein und einer damit bindefähigen Substanz durch Inkubation einer Probelösung mit einer vorher festgelegten Menge Bindungskomponente in unlöslicher Form in Gegenwart eines Reagens, welches eine bekannte Menge einer der Bindungskomponenten in enzymmarkierter Form enthält, Trennung der flüssigen von der festen Phase durch Zentrifugieren und Bestimmung der in der flüssigen Phase verbliebenen Aktivität des Markierungsenzyms führt die Messung der Enzymaktivität in einem Zentrifugenrotor während oder nach der Einwirkung der erhöhten Schwerkraft durch solange feste und flüssige Phase noch miteinander in Kontakt stehen.



EP 0 054 675 A1

# Verfahren zur Enzymimmunobestimmung in heterogener Phase.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung einer Komponente der Reaktion zwischen einem spezifisch bindenden Protein und einer damit bindefähigen Substanz unter Anwendung des Prinzips des Enzymimmuno-Verfahrens in heterogener Phase.

Aufgrund der ständig steigenden Zahl von klinisch-chemischen Analysen von Serumbestandteilen und ähnlichen biologischen Materialien gewinnt die Automatisierbarkeit derartiger Methoden ständig weiter an Bedeutung. Nur durch Automatisierung läßt sich die stark steigende Zahl derartiger Bestimmungen bewältigen und dabei auch der erforderliche Arbeitsaufwand pro Bestimmung herabsetzen. In neuerer Zeit haben dabei Analysenautomaten, die auf dem Zentrifugalanalysenprinzip beruhen, große Bedeutung erlangt, da sie eine weitere Erhöhung der Analysenfrequenz ohne besondere Steigerung der Anlagenkosten ermöglicht (G-i-T, Fachz. Lab. 21 (1977), 866-874).

Für die klinische Diagnostik steigt in neuerer Zeit auch die Bedeutung von Verfahren zur Bestimmung von Partnern von Immunreaktionen. Einen wesentlichen Fortschritt brachte dabei die Methode der Radioimmunanalyse (RIA), da sie eine wesentliche Erhöhung der Empfindlichkeit derartiger Bestimmungen mit sich brachte. Ein Nachteil des RIA, nämlich die Notwendigkeit, mit radioaktiven Substanzen umzugehen,

- 1 wurde beseitigt durch den Ersatz der radioaktiven Markie-  
rung durch eine Enzymmarkierung, was zum sogenannten Enzym-  
Immuno-Assay (EIA) führte. Bei einer Ausführungsform eines  
5 derartigen Verfahren, die üblicherweise als ELISA-Methode  
bezeichnet wird, wird eine Komponente der Reaktion zwischen  
einem spezifisch bindenden Protein und einer damit binde-  
fähigen Substanz bestimmt, indem man eine Probelösung mit  
unbekanntem Gehalt an der zu bestimmenden Substanz mit  
einer vorher festgelegten Menge einer Bindungskomponente  
10 in unlöslicher Form in Gegenwart eines Reagenz inkubiert,  
welche eine bekannte Menge einer der Bindungskomponenten  
in enzymmarkierter Form enthält. Nach Trennung der flüs-  
sigen von der festen Phase stellt die in der flüssigen  
Phase verbliebene Aktivität des Markierungsenzyms ein Maß  
15 für die in der Probelösung vorhandene unbekannte Menge  
der zu bestimmenden Komponente der Immunreaktion dar (vgl.  
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Vol. 18 (1980) 197-208).  
Dieser heterogene Enzymimmunotest beseitigt zwar die Not-  
wendigkeit, mit radioaktiven Substanzen zu arbeiten, der  
20 dabei erforderliche Trennungsschritt bereitet jedoch bei  
der Automatisierung Schwierigkeiten und erfordert zusätz-  
liche Maßnahmen, wie sie beispielsweise in der DE-OS 27 36  
527 beschrieben werden.
- 25 Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, ein der-  
artiges Enzym-Immuno-Testverfahren so zu gestalten, daß  
die Automatisierbarkeit verbessert wird und insbesondere  
eine Durchführung an Zentrifugalanalysatoren ermöglicht  
wird.
- 30 Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Ver-  
fahren zur Bestimmung einer Komponente der Reaktion zwi-  
schen einem spezifisch bindenden Protein und einer da-  
mit bindefähigen Substanz durch Inkubation einer Probe-  
35 lösung mit einer vorher festgelegten Menge Bindungskom-  
ponente in unlöslicher Form in Gegenwart eines Reagenz,

- 1 welches eine bekannte Menge einer der Bindungskomponenten  
in enzyymmarkierter Form enthält, Trennung der flüssigen  
von der festen Phase durch Zentrifugieren und Bestimmung  
der in der flüssigen Phase verbliebenen Aktivität des Mar-  
5 kierungsenzyms, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß  
man die Messung der Enzymaktivität in einem Zentrifugen-  
rotor während oder nach der Einwirkung der erhöhten Schwer-  
kraft durchführt, solange feste und flüssige Phase noch  
miteinander in Kontakt stehen.
- 10 Die Erfindung beruht auf der sehr überraschenden Tatsache,  
daß unter dem Einfluß der Schwerkraft in einem Zentrifugen-  
rotor der an die feste Phase gebundene Anteil des Enzyms  
an der Enzymreaktion praktisch nicht teilnimmt, so daß  
15 unter den erfindungsgemäßen Bedingungen bei der Messung  
der Enzymaktivität nur das in der flüssigen Phase vorlie-  
gende Enzym wirksam wird, während das damit in direktem  
Kontakt stehende, infolge der Einwirkung der erhöhten  
Schwerkraft aber an die Behälterwand gebundene Enzym bei  
20 der Bestimmung nicht erfaßt wird. Bei einem Zentrifugal-  
analysator werden ja die Komponenten einer Reaktion üb-  
licherweise zuerst unter dem Einfluß der Schwerkraft ge-  
mischt und dann in ein Bestimmungsgefäß weitergefordert,  
welches als eine Art Küvette ausgebildet ist, in der wäh-  
25 rend des Rotorlaufs die Messung durchgeführt wird. An der  
Küvettenwand, auf welche die Schwerkraft wirkt, sammelt  
sich nun beim Verfahren der Erfindung das an die feste Pha-  
se gebundene Markerenzym an, wird also insoweit zwar dem  
Lichtstrahl, der für die Messung durch die Küvette ge-  
30 schickt wird, entzogen, bleibt aber weiterhin in Kontakt  
mit der Reagenzlösung und kann daher auch an Umsetzungen  
in der Reagenzlösung weiter teilnehmen. Diese Teilnahme  
von in fester Phase gebundenen Enzymen an Reaktionen in  
der Lösung wird gerade bei den trägergebundenen Enzymen  
35 technisch in weitem Umfang ausgenutzt. Falls man überhaupt  
eine Einwirkung des Schwerkraftfelds bei derartigen Reak-

1 tionen erwartet hätte, so allenfalls eine verstärkte Teil-  
nahme des an die Behälterwand zentrifugierten Enzyms, da  
eine Wanderung der Reaktionspartner unter dem Einfluß der  
Schwerkraft, wenn überhaupt, so nur in Richtung ihrer Wir-  
5 kung, d.h. zum in fester Phase vorliegenden Enzym, aber  
nicht vom Festphasenenzym weg zu erwarten war.

Die Erfindung macht es möglich, die bis jetzt als abso-  
lut unumgänglich angesehenen Verfahrensschritte: Trennung  
10 von fester und flüssiger Phase und Waschen der festen Pha-  
se (Dt. Ges. f. Klin. Chemie, Mitteilungen 1/79,  
22-30), überflüssig gemacht werden und das Verfahren auf  
üblichen Zentrifugenanalysatoren durchführbar wird. Das  
wesentliche Hindernis bei der Durchführung der ELISA-  
15 Technik auf Analysenautomaten wird damit beseitigt.

Die unlösliche Komponente der Enzymreaktion wird beim er-  
findungsgemäßen Verfahren vorzugsweise in trägergebundener  
Form eingesetzt. Die Trägerbindung kann nach den für die  
20 Immobilisierung von biologisch aktiven Substanzen dem Fach-  
mann bekannten Methoden erfolgen. Alternativ kann die un-  
lösliche Komponente auch in vernetzter Form eingesetzt  
werden, beispielsweise durch an sich bekannte Umsetzung  
mit multifunktionalen Vernetzungsmitteln. Derartige Ver-  
25 netzungsmittel, wie Glutardialdehyd, usw. sind dem Fach-  
mann bekannt und brauchen hier nicht näher erläutert zu wer-  
den. Vernetzung und Trägerfixierung können auch kombiniert  
angewendet werden, indem eine Komponente der Immunreaktion  
auf einem Träger durch Vernetzung fixiert wird. Besonders  
30 zweckmäßig wird die unlösliche Komponente in Teilchenform  
eingesetzt, entweder an einen teilförmigen Träger fixiert  
oder durch trägerfreie Vernetzung in Teilchenform über-  
führt.

35 Der Träger für die unlösliche Komponente kann, wenn er  
verwendet wird, flüssig oder fest sein. Gemäß einer be-  
sonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung setzt

- 1 man die unlösliche Komponente der Immunreaktion an Latex-  
teilchen gebunden ein. Ein besonderer Vorzug von Latex-  
partikeln liegt in ihrer Dichte, die sie in wäßriger Lö-  
sung in Schwebe hält. Zu diesem Zweck besonders geeignete  
5 Latexpartikel sind in der gleichzeitig unter der internen  
Nr. 2350 unter der Bezeichnung "Hydrophile Latexpartikel,  
Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung" ein-  
gereichten Patentanmeldung beschrieben (Kopie beigelegt).  
Diese hydrophilen Latexpartikel bestehen aus einem Homo-  
10 oder Copolymerisat von in Wasser schwerlöslichen Monomeren  
und sind durch Emulsionspolymerisation in Anwesenheit eines  
wasserlöslichen, Radikale bildenden Initiators, jedoch ohne  
Zusatz eines Emulgators, Stabilisators oder Netzmittels,  
herstellbar. Die Herstellung erfolgt in wäßriger Disper-  
15 sion des oder der Monomeren durch Emulsionspolymerisation  
in Abwesenheit von Sauerstoff.

Im Rahmen der Erfindung sind jedoch auch andere Träger ge-  
eignet, wie sie üblicherweise für die Fixierung von biolo-  
20 gisch aktiven Proteinen verwendet werden, beispielsweise  
unlösliche Kohlenhydrate, wie Cellulosederivate, vernetz-  
tes Dextran, hydrophile Polymere und Copolymere, insbe-  
sondere auf Basis von Acrylamid und dergleichen.

- 25 Die im Rahmen der Erfindung erforderliche Schwerkraft ent-  
spricht den bei handelsüblichen Zentrifugalanalysenauto-  
maten normalerweise auftretenden Werten.

Alle übrigen Bedingungen, die beim Verfahren einzuhalten  
30 sind, entsprechen den für die jeweilige Bestimmung nach  
der ELISA-Technik bekannten Bedingungen. Sie werden im  
wesentlichen durch die pH- und Puffer-Abhängigkeit des  
Markerenzymys bestimmt. Diese Bedingungen sind dem Fachmann  
bekannt. Auch Konzentrationen und Inkubationszeiten können  
35 den bisher bekannten Werten entsprechen.

1 Auch hinsichtlich der verwendbaren Markerenzyme bestehen  
keine Beschränkungen. Alle für die ELISA-Technik geeig-  
neten Markerenzyme lassen sich auch im Rahmen der Erfin-  
dung anwenden.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich für die ver-  
schiedensten bekannten Abwandlungen der ELISA-Technik, also  
die sogenannte kompetitive Enzym-Immuno-Testmethode, die  
kompetitive Sandwich-Methode, die Sandwich-Antigen-Metho-  
10 de, die Sandwich-Antikörper-Methode und die immuno-enzymo-  
metrische Methode. Diese Methoden sind in der oben erwähn-  
ten Literaturstelle J. Clin. Chem. Clin. Biochem. schema-  
tisch erläutert. Beispiele für geeignete Markerenzyme  
sind Peroxidase, Glucoseoxidase, Galactosidase, alkali-  
15 sche Phosphatase, Glucoamylase, Acetylcholinesterase und  
Katalase.

Typische Beispiele für Antigene oder Haptene, die mit  
dem erfindungsgemäßen Verfahren bestimmt werden können,  
20 sind Thyroxin, Digoxin, Östriol,  $\alpha_1$ -Fetoprotein, Insulin,  
Thyrotropin, Ferritin, carcinoembryonales Antigen, HB<sub>2</sub>-  
Antigen und ähnliche. In gleicher Weise können die korres-  
pondierenden oder beliebige andere Antikörper bestimmt  
werden.

25

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

#### B e i s p i e l 1

30 Verwendete Reagenzien:

a) Sepharose-Anti-T<sub>4</sub>-Antikörper (T<sub>4</sub> = Tetrajod-Tyrosin =  
Thyroxin)

1 g handelsübliche bromcyanaktivierte vernetzte Agaro-  
se (Sephase) wurde nach Vorschrift des Herstellers  
35 mit 10 ml Anti-T<sub>4</sub>-Immunglobulin (Anti-T<sub>4</sub>-IgG von Kanin-  
chen) gekuppelt, wobei das Anti-T<sub>4</sub>-IgG aus Anti-T<sub>4</sub>-An-



- 1 tiserum durch Fällung mit 14 %-iger (w/v) Ammonium-  
sulfatlösung gewonnen worden ist (Probelösung)
- b)  $T_4$ -Glucoseoxidase ( $T_4$ -GOD)
- 5 200 mg (= 1.07  $\mu$ M) lyophilisierte Glucoseoxidase werden  
in 20 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,6, gelöst und trop-  
fenweise unter Kühlen und Rühren mit 18,8 ml Dimethyl-  
formamid versetzt. Zu dieser Lösung werden 15 mg (=
- 10 15,4 $\mu$ M) BOC- $T_4$ -OSu (Su = Succinimid), in 1,2 ml Dime-  
thylformamid gelöst, innerhalb 3 Stunden in 400 $\mu$ l-  
Portionen zugesetzt. Die Reaktionslösung wird 20 Stun-  
den bei 4°C unter Rühren und Lichtausschluß gehalten.  
Eine auftretende leichte Trübung wird abzentrifugiert.  
Die überstehende Lösung wird an Molekularsieb auf Ba-
- 15 sis von vernetztem Dextran (Sephasex G-25, fine) in  
40 mM Tris-Puffer, pH 7,5, und 150 mM Natriumchlorid  
aufgetrennt. Die erste Fraktion (Front) wird aufgefan-  
gen: 86 ml. Die erhaltene Lösung wird zweimal gegen
- 20 12 l 40 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, dialysiert. Die so  
erhaltene GOD- $T_4$  enthaltende Lösung wird für die folgen-  
den Experimente im Verhältnis 1 : 10 mit Phosphatpuf-  
fer, pH 6,5, verdünnt.
- c) Enzymsubstratlösung
- 25 20 mg Peroxidase (POD), 4,6 g 2,2'-Azino-di-[3-äthyl-  
benzthiazolinsulfonat(6)] und 50 g Glucose werden mit  
0,01 M Phosphat/Citrat-Puffer, pH 5,6, und 0,1 % Poly-  
oxyäthylensorbitanmonooleat (Tween 20) auf ein Endvo-
- 30 lumen von 1 l gebracht.
- d) Versuchsdurchführung
- Verschiedene, jeweils bekannte Menge an der unter a)  
beschriebenen Sepharose-Anti- $T_4$ -IgG-Lösung (50/100/200/  
500/1000 $\mu$ l) werden mit jeweils 100 $\mu$ l der unter b) be-
- 35 schriebenen  $T_4$ -GOD-Lösung vermischt und 15 Minuten  
bei Raumtemperatur gerührt. 35 $\mu$ l dieses Inkubationsge-

1 misches werden in die Probemulde eines handelsüblichen  
Zentrifugalanalysenautomaten (CentrifiChem 400) gege-  
ben. In den Reagenzbereich werden 60µl des unter c) be-  
schriebenen Enzymsubstrat-Gemisches gefüllt. Danach  
5 wird zentrifugiert und währenddessen die Extinktion bei  
405 nm gemessen. Fig. 1 der Zeichnung zeigt in graphi-  
scher Darstellung die Abnahme der Extinktion, gemessen  
nach 25 Minuten ab Beginn der Zentrifugation, gegen die  
Zunahme des Sepharose-Anti-T<sub>4</sub>-IgG-Gehalts aufgetragen.

10

### B e i s p i e l 2

100 µl Sepharose-Anti-T<sub>4</sub>-IgG, 9-0µl 0,1 M Phosphatpuffer,  
pH 7,0, 100µl T<sub>4</sub>-GOD-Lösung und 100µl eines T<sub>4</sub>-Standards  
15 in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, werden 1 Stunde gerührt.  
35µl dieses Inkubationsgemisches werden wie in Beispiel 1  
d) beschrieben am Zentrifugalanalysenautomaten weiterbe-  
handelt. Durch Einsatz von T<sub>4</sub>-Standardlösungen unterschied-  
lichen T<sub>4</sub>-Gehalts wird eine Eichkurve erstellt. Die ermit-  
20 telten Werte sind in Fig. 2 dargestellt. Anhand dieser  
Eichkurve lassen sich unbekannte T<sub>4</sub>-Konzentrationen be-  
stimmen. Hierzu wird in der oben beschriebenen Weise ver-  
fahren, jedoch wird anstelle der T<sub>4</sub>-Standardlösung eine  
entsprechende Menge der Probe mit unbekanntem T<sub>4</sub>-Gehalt  
25 eingesetzt.

### B e i s p i e l 3

#### Verwendete Reagenzien

30

#### a) Latex-Anti-T<sub>4</sub>-Antikörper

T<sub>4</sub>-Antikörper aus einem Anti-T<sub>4</sub>-Serum vom Schaf werden  
an Homopolyglycidylmethacrylat-Latexpartikel (herge-  
stellt nach Patentanmeldung P ..., interne Nr. 2350)  
35 in der dort angegebenen Weise kovalent gebunden.

- 1 b)  $T_4$ - $\beta$ -Galactosidase ( $T_4$ - $\beta$ -Gal)

$T_4$  wird analog Beispiel 1 b) mit  $\beta$ -Gal markiert.

- c)  $\beta$ -Gal-Substratlösung

5 450 mg/l p-Nitrophenyl- $\beta$ -galactosidase (Fa. Sigma)

100 mM Natriumchlorid

10 mM Magnesiumchlorid

10 mM Tris-Puffer/HCl, pH-Wert 7,3

0,4 % (V/) Mercaptoäthanol

10

- d) Versuchsdurchführung

0,5 ml einer verdünnten Latex-Anti- $T_4$ -Suspension werden mit 100 $\mu$ l einer  $T_4$ -Serum-Standardlösung mit verschiedenem, jeweils bekanntem  $T_4$ -Behalt und 100 $\mu$ l

15 einer  $T_4$ - $\beta$ -Gal-Konjugatlösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. 35  $\mu$ l des jeweiligen Inkubationsgemisches

werden in die Probemulde eines handelsüblichen Zentrifugalanalysenautomaten (CentrifiChem 400) gegeben.

20 In den Reagenzbereich dieses Zentrifugalanalysators werden 60 $\mu$ l der unter c) beschriebenen Substratlösung gefüllt. Danach wird zentrifugiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

25 Nachdem auf diese Weise die  $T_4$ -Eichkurve ermittelt wurde, wurden anschließend in derselben Weise Bestimmungen durchgeführt, bei denen anstelle von 100 $\mu$ l  $T_4$ -Standardserum jeweils 100 $\mu$ l von Proben mit unbekanntem  $T_4$ -Gehalt eingesetzt wurden.

30

35

1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung einer Komponente der Reaktion zwischen einem spezifisch bindenden Protein und einer damit bindefähigen Substanz durch Inkubation einer Probelösung mit einer vorher festgelegten Menge Bindungskomponente in unlöslicher Form in Gegenwart eines Reagenz, welches eine bekannte Menge einer der Bindungskomponenten in enzymmarkierter Form enthält, Trennung der flüssigen von der festen Phase durch Zentrifugieren und Bestimmung der in der flüssigen Phase verbliebenen Aktivität des Markierungsenzyms, dadurch gekennzeichnet, daß man die Messung der Enzymaktivität in einem Zentrifugenrotor während oder nach der Einwirkung der erhöhten Schwerkraft durchführt, solange feste und flüssige Phase noch miteinander in Kontakt stehen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die unlösliche Komponente in trägergebundener Form einsetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die unlösliche Komponente in vernetzter Form einsetzt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die unlösliche Komponente in Teilchenform einsetzt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die unlösliche Komponente an Latexteilchen gebunden einsetzt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als unlösliche Komponente einen Antikörper oder Anti-Antikörper verwendet.

1 7. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß  
man als enzymmarkierte Komponente ein Antigen, Hapten,  
einen Antikörper oder einen Anti-Antikörper verwendet.

5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch  
gekennzeichnet, daß man als unlösliche Komponente ein  
Antigen oder Hapten und als enzymmarkierte Komponente  
einen Antikörper verwendet.

10

15

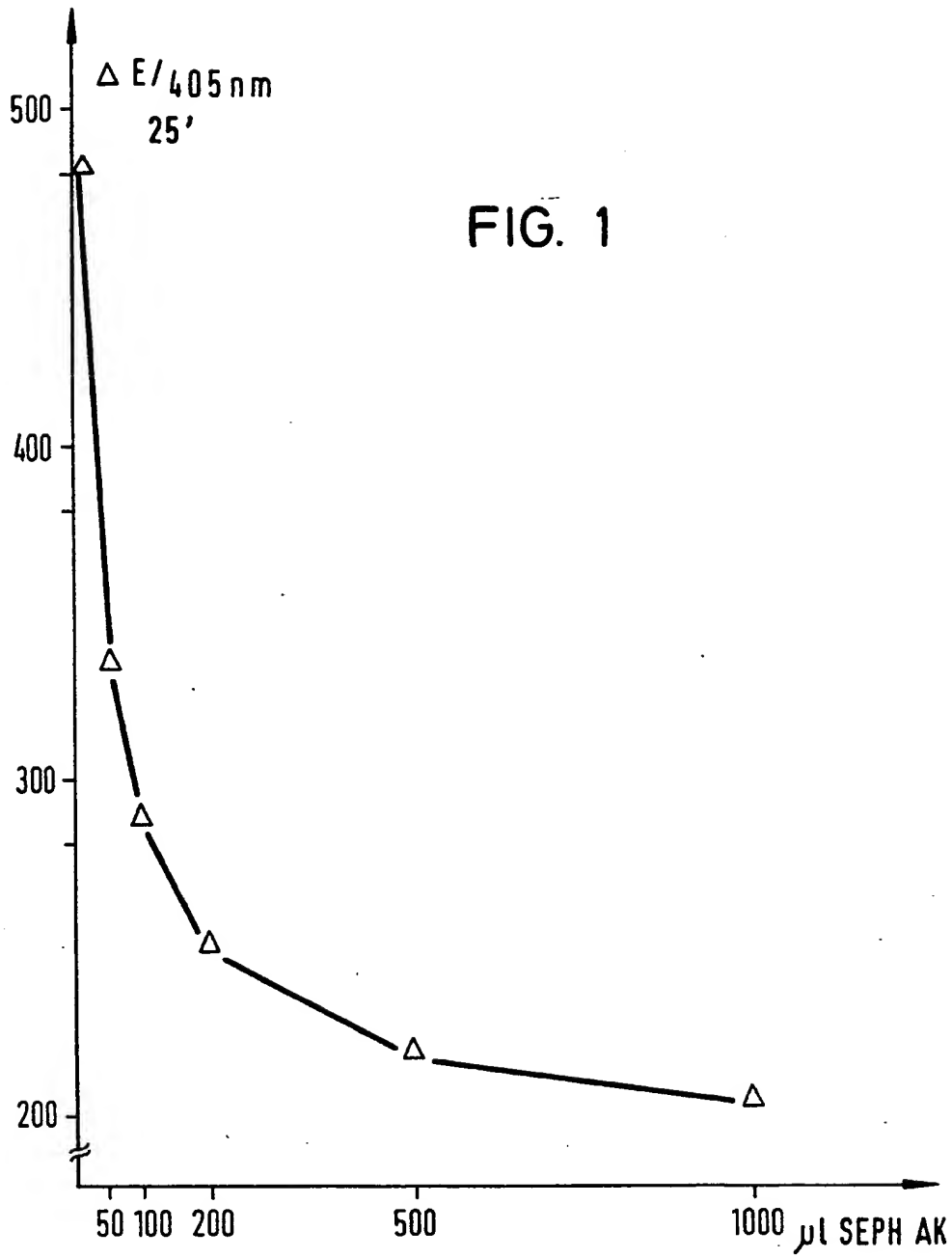
20

25

30

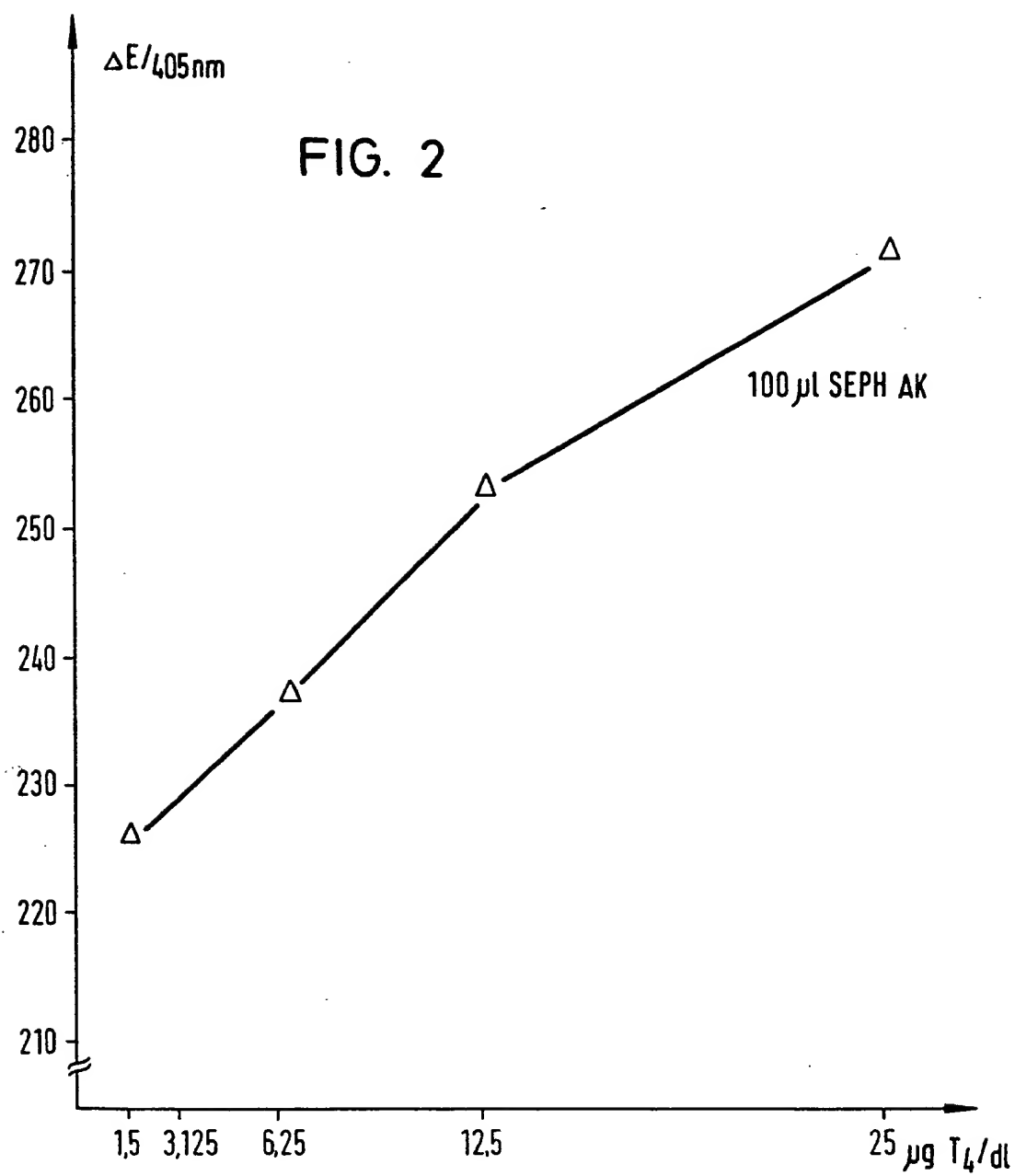
35

1/2



2/2

0054675





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0054675

EP 81 10 8754

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
Y	US - A - 3 839 153 (SCHUURS et al.) * Zusammenfassung; Beispiele I,II,III,IV * & DE - A - 2 164 768 --	1-8	G 01 N 33/54
Y	DE - A - 2 938 646 (BECTON) * Ansprüche 1,2,6; Seite 28, Zeilen 15-35; Seite 29, Zeilen 1-30 *	1,2,6, 7	
A	FR - A - 2 418 463 (CENTRE NATIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE) * Seite 5, Zeilen 35-38; Seite 6, Zeilen 1-25; Seite 14, Zeilen 23-38; Seite 15, Zeilen 1-34 *	1	G 01 N
DA	FR - A - 2 365 124 (BOEHRINGER MANNHEIM) * Seite 3, Zeile 24 - Seite 5, Zeile 38 * & DE - A - 2 736 527 ----	2-8	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)
			KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE
			X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
Den Haag	05-04-1982	DE LUCA	